

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ *IN PLANTA*

І. Р. Горбатюк, М. О. Банникова, Б. В. Моргун

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

За останні роки широкої популярності набуває метод генетичної трансформації рослин *in planta* за допомогою агробактерій. Цей метод стає все більш конкурентоздатним по відношенню до «класичного» методу – *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та біолістичної трансформації.

Використовуючи методи генетичної трансформації *in vitro*, більшість вчених зіштовхуються з численними труднощами, а саме: можливість появи соматиклонів; залежність ефективності трансформації від генотипу досліджуваного об'єкту, довготривалість експериментів. Поряд із цим, часто виникають проблеми, пов'язані з регенерацією трансформантів. Так, в однодольних отримання фертильних рослин утруднено через низький морфогенетичний потенціал [1]. Крім того, не можна залишати поза увагою й етап адаптації до нестерильних умов вирощування, оскільки саме на ньому трансгенні рослини можуть бути втрачені, а це, в свою чергу, призводить до зменшення кількості отриманих трансформантів [2]. Тому, тривають пошуки альтернативних або більш досконалих біотехнологічних методів отримання генетично трансформованих рослин.

Одним із таких методів є *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, оскільки він дозволяє уникнути соматоклональної мінливості, яка зустрічається під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro* [2, 3], а також виключає використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів. З огляду на це, метою нашого дослідження було провести *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* пшениці *T. aestivum* озимого сорту Подолянка.

У дослідженні використовували рослини пшениці, отримані з насіння озимого сорту Подолянка, яке було надане Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України [4].

Для проведення трансформації *in planta* обирали колоси довжиною 5-7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка [5]. Проводили кастрування, залишаючи по 12-14 колосочків на колос. Через три доби проводили інокуляцію суспензією нічної культури агробактерій. Запилення проводили після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії.

У дослідженні використовували штам ABI *Agrobacterium tumefaciens*, що містив генетичну конструкцію p014, до складу якої входили послідовності генів *nptII* та *sgfp*.

Отримане насіння пшениці вирощували в умовах мікроділянкового дослід. Рослини покоління T₀ (листя) аналізували на присутність послідовностей генів *nptII*, *sgfp* і вірулентності (*VirC*) за використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Колоси озимого сорту Подолянка (24 шт.) кастрували, обробляли агробактеріальною суспензією та запиляли пилом, отриманим з іншого колосу тієї ж рослини. Після завершення вегетаційного періоду отримано 293 насінини з 620 прокастрованих та оброблених агробактеріальною суспензією колосків. Таким чином, середня зав'язуваність насіння складала 46,4±2,4%. Отримане насіння T₀ було висіяно у ґрунт. Після того, як рослини досягли фази двох листків, частину одного з листків зрізали для проведення ПЛР-аналізу.

Серед проаналізованих 175 рослин T₀ тільки у дев'яти виявлено позитивний сигнал присутності послідовності гену *nptII*. Аналогічно, за допомогою ПЛР проводили визначення наявності послідовності гена зеленого флуоресцентного білку у відібраних рослинах, в яких попередньо виявили присутність *nptII* трансгену. Присутність послідовності гену *sgfp* доведена лише у 4 рослин, що складає 2,3 % (відсоток трансформації одночасно за обома генами: *nptII* та *sgfp*) від протестованих 175 рослин.

Для того, щоб виключити бактеріальну контамінацію проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C*. Результати полімеразної ланцюгової реакції свідчать про відсутність бактеріального зараження за умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та дозволяють стверджувати, що Т-ДНК вбудувалась в рослинний геном.

Таким чином, доведено можливість отримання генетичних трансформантів пшениці озимого сорту Подолянка шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

Література

1. Curtis I. S. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency / I. S. Curtis, H. G. Nam // Transgenic Research. – 2001. – V. 10. – P. 363-371.
2. Subramanian M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *in planta* seed transformation strategy in sugarcane / [M. Subramanyam, M. Arun, M. Rajesh, et al.] // Plant Cell Reports. – 2013. – Vol. 32, № 10. – P. 1557-1574.
3. Чумаков М. И. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* / М. И. Чумаков, Е. М. Моисеева // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 8-20.
4. Гончарук О. М. Морфогенетичний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів / О. М. Гончарук, А. В. Бавол, О. В. Дубровна // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць. – 2011. – Т. 11. – С. 237-241.
5. Agarwal S. Floral transformation of wheat / [S. Agarwal, S. Loar, C. M. Steber, J. Zale] // Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats. – 2009. – Vol. 478. – P. 105-113.